



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 195 45 126 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/63
C 12 N 15/79
C 12 N 15/55
C 12 N 9/14
C 12 N 5/10
C 12 Q 1/34
C 12 Q 1/68
C 12 P 19/34

②1 Aktenzeichen: 195 45 126.0
②2 Anmeldetag: 4. 12. 95
④3 Offenlegungstag: 5. 6. 97

DE 195 45 126 A 1

⑦1 Anmelder:
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

⑦2 Erfinder:
Kirschbaum, Bernd, Dr., 55122 Mainz, DE; Müllner,
Stefan, Dr., 65239 Hochheim, DE; Bartlett, Robert,
Dr., 64291 Darmstadt, DE

⑤4 ATP- und Nukleinsäure-bindendes Protein mit Helikase-Eigenschaften

⑤7 Die vorliegende Erfindung hat die Identifizierung und molekulargenetische und biochemische Charakterisierung eines ATP- und Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften, sowie Verfahren zu dessen Herstellung und Anwendung in pharmakologisch relevanten Testsystemen zum Gegenstand.

DE 195 45 126 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 04. 97 702 023/452

26/29

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung hat die Identifizierung und molekularbiologische und biochemische Charakterisierung eines ATP- und Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften, sowie Verfahren zu dessen Herstellung und Anwendung in pharmakologisch relevanten Testsystemen zum Gegenstand.

Die Modulation der RNA-Struktur ist ein wesentlicher regulatorischer Prozeß bei vielen zellulären Vorgängen, wie z. B. mRNA-Splicing, Zusammenbau von Ribosomen, Proteintranslation, die unter dem Oberbegriff "Regulation der Genexpression" zusammengefaßt werden können. Die sogenannte "DEAD-Box"-Proteinfamilie von RNA-Helikasen benannt nach dem charakteristischen Aminosäure-Motiv Asp—Glu—Ala—Asp (im Einbuchstabencode DEAD)—spielt hierbei, (insbesondere für die Modulation der Sekundär- und Tertiärstruktur von mRNA), eine Schlüsselrolle. Obwohl die Mitglieder dieser Familie und einiger Unterfamilien Unterschiede in ihrer spezifischen Funktion und zellulären Lokalisation besitzen, zeigen sie neben charakteristischen Sequenzhomologien auch ähnliche biochemische Eigenschaften (F.V. Fuller-Pace, Trends in Cell Biology, Vol 4, 1994, 271—274). Die charakteristischen Protein-Sequenzen der DEAD-Proteine sind in der Evolution hoch konserviert (S.R. Schmid and P. Lindner, Molecular and Cellular Biology, Voll 1, 1991, 3463—3471). Mitglieder dieser Protein-Familie finden sich in verschiedenen Viren, Bakterien, Hefen, Insekten, Molusken, niederen Wirbeltieren bis hin zu Säugetieren und zeichnen verantwortlich für eine große Zahl von zellulären Funktionen. Die Tatsache, daß schon relativ einfache Organismen wie z. B. die Hefe *Saccharomyces Cerevisiae* zahlreiche Proteine der DEAD-Box-Proteinfamilie und deren Subfamilien exprimieren, deutet daraufhin, daß möglicherweise jedes dieser Proteine mit einer spezifischen RNA oder RNA-Familie wechselwirkt (I. Iost and M. Dreyfus, Nature Vol 372, 1994, 193—196). Translationsfaktoren, wie z. B. eIF-4A sowie die am prä-mRNA-Splicing-Prozess beteiligten Proteine erkennen nachgewiesenermaßen spezifische RNA-Zielsequenzen bzw. -strukturen. Dennoch gibt es bisher nur wenig Informationen über Struktur und Aufbau charakteristischer RNA-Sequenzen, welche die DEAD-Proteine zur Erkennung und zur ATPase/RNA-Helikase-Reaktion benötigen (A. Pause and N. Sonenberg, Current Opinion in Structural Biology Vol 3, 1993, 953—959).

Die DEAD-Box-Protein-Familie ist eine gegenwärtig ständig wachsende Enzymklasse, die an den vielfältigen Reaktionen zur post-transkriptionalen Regulation der Genexpression beteiligt ist. Wegen der hohen Zahl von unterschiedlichen zellulären DEAD-Box-Proteinen ist zu erwarten, daß bestimmten Klassen von Genprodukten, z. B. viralen Proteinen, Heat-shock Proteinen, Antikörper- und MHC-Proteinen, Rezeptoren, RNA's etc., spezifische RNA-Helikasen zugeordnet sind. Diese Tatsache empfiehlt diese Proteinfamilie als interessantes pharmakologisches Target für die Wirkstoffentwicklung.

Zwei der Subklassen der DEAD-Box-Proteine sind die DEAH- (mit einem spezifischen Aminosäureaustausch) und die DEXH-Proteine (mit zwei Aminosäureaustauschen im Hauptmotiv, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht) Familien, die ebenfalls bei der Replikation, Rekombination, Reparatur und Expression von DNA und RNA Genomen mitwirken (Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Dochenko, A.P., Blinov, V.M., 1989: Nucleic Acids Res. 17, 4713—4729). Die DEAD-Box-Proteine und deren Subfamilien werden oft als Helikase-Superfamilie II zusammengefaßt (Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., 1992: FEBS 298, 6—8), da sie sieben hochkonservierte Regionen teilen. Insgesamt gehören dieser stetig wachsenden Superfamilie II bislang über 70 Mitglieder an.

Eine schematische Darstellung der DEAD, DEAH und DEXH Familien (Schmid, S.R., Lindner P., 1991: Molecular and Cellular Biology 11, 3463—3471) zeigt die Ähnlichkeit zwischen den Familien. (Die Nummern zwischen diesen Regionen zeigen die Abstände in Aminosäuren (AS). X steht für eine beliebige AS. Wo bekannt, wurden den Bereichen Funktionen zugeordnet.)

DEAD-FAMILIE

ATPase A Motiv ATPase B Motiv 5

NH₂-----AXXXGKT-----PTRELA-----GG-----TPGR-----DEAD-----SAT-----FXXXT-----

21-299 24-42 22-28 19-27 19-22 27-51 59-70 52-53 10

RGXD-----HRIGRXXR-----COOH 15

20 24-236

eIF-4A 20

NH₂-----AXXXXGKT-----PTRELA-----GG-----TPGR-----DEAD-----SAT-----FINT----- 25

75 24 22 20 20 27 62 52

RGID-----HRIGRXXR-----COOH 30

20 41

DEAH-SUBFAMILIE 35

NH₂-----GXXXXGKT-----RVAA-----XX-----TDGX-----DEAH-----SAT-----FXT----- 40

245-505 22-24 29 7-8 19 28 58-61 75-84 45

XGXX-----QRIGRXGR-----COOH 50

25 315-373

DEXH-SUBFAMILIE 55

NH₂-----XXXXXGKT-----PTRXXX-----DEXH-----TAT-----FXXS----- 60

81-1904 19-27 55-60 24-30 44-72 46-55

XGXX-----QRXGRXGR-----COOH 65

38-44 155-1799

Das ATPase-Motiv (AXXXXGKT) ist eine aminoterminal konservierte Region und kommt bei den meisten

Nucleotid-bindenden Proteinen vor, so auch bei anderen DNA- und RNA-wechselwirkenden Proteinen wie DNAB (Teil des Primosoms), UvrD (Endonuklease), Elongationsfaktor 1 und Transkriptionsterminationsfaktor Rho (Ford M.J., Anton, I.A., Lane, D.P., 1988: Nature 332, 736–738).

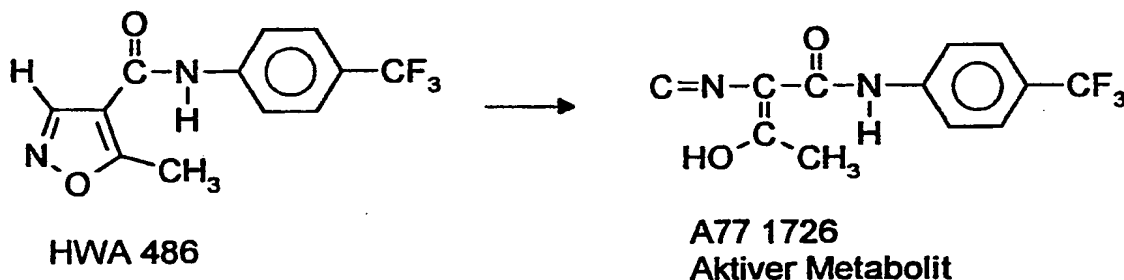
Die zweite konservierte Region ist die sogenannte DEAD-Box, bzw. DEAH, DEXH oder DEXX in anderen Familien der Helikasen und Nucleinsäureabhängige ATPasen. Diese Region stellt das ATPase B-Motiv dar. Bei dem Reaktionsmechanismus bindet die erste Asparaginsäure über ein Wassermolekül Mg^{2+} (Pai, E.F., Kregel, U., Petsko, G.A., Gody, R.S., Katsch, W., Wittinghofer, A., 1990: EMBO J. 9, 2351–2359). Mg^{2+} wiederum bildet einen Komplex mit dem β - und γ -Phosphat des Nucleotids und ist essentiell für die ATPase-Aktivität. Substitutionen der ersten beiden Reste der DEAD-Region in eIF-4A verhindern die ATP-Hydrolyse und die RNA-Helikase Aktivität, nicht aber die ATP-Bindung (Pause, A., Sonenberg, N., 1992: EMBO J. 11, 2643–2654). Die DEAD-Region koppelt außerdem die RNA-Helikase Aktivität mit der ATPase-Aktivität.

Die dritte untersuchte Region ist die SAT-Region (manchmal auch TAT). Durch Mutation in diesem Bereich wird die RNA-Helikase Aktivität unterbunden, andere biochemische Eigenschaften bleiben jedoch erhalten (Pause A. & Sonenberg N., 1992).

Die am weitesten carboxyterminale Region ist die HRIGRXXR-Region, die für die RNA-Bindung und ATP-Hydrolyse erforderlich ist.

Aus den oben aufgeführten Zusammenhängen ergibt sich, daß spezifische RNA-Helikasen attraktive Targets für pharmazeutische Wirkstoffe darstellen. Da auch von bestimmten pathogenen Viren, welche Krankheiten bei Menschen, Tieren oder Pflanzen hervorrufen können, beispielsweise bekannt ist, daß sie ihre eigene RNA-Helikase im Genom tragen, die für die akkurate Replikation benötigt wird (E.V. Koonin, 1991), liegt eine Anwendung auch im Pflanzenschutz nahe (F.V. Fuller-Pace, Trends in Cell Biology, Vol. 4, 1994, 271–274).

Das Isoxazolderivat Leflunomid (HWA486; R.R. Bartlett, G. Campion, P. Musikic, T. Zielinski, H.U. Schorlemmer in: A.L. Lewis and D.E. Furst (editors), Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Mechanisms and Clinical Uses; C.C.A. Küchle, G.H. Thoenes, K.H. Langer, H.U. Schorlemmer, R.R. Bartlett, R. Schleyerbach, Transplant Proc. 1991, 23: 1083–6; T. Zielinski, H.J. Müller, R.R. Bartlett, Agents Action 1993, 38: C80–2), zeigt entzündungshemmende und immunsuppressive Eigenschaften, ohne eine Schädigung der bestehenden Funktionen des Immunsystems hervorzurufen. Viele Aktivitäten, wie die Änderung der Zellaktivierung, der Proliferation, der Differenzierung und der Zellkooperation, die bei Autoimmunkrankheiten beobachtet werden können, werden durch Leflunomid bzw. dessen aktiven Metaboliten A77 1726, moduliert.



Studien über den molekularen Wirkungsmechanismus dieses Wirkstoffs deuten auf einen Einfluß auf den Pyrimidinstoffwechsel hin. Da Leflunomid sehr schnell im Organismus in A77 1726 übergeführt wird, werden beide Bezeichnungen in der vorliegenden Anmeldung praktisch synonym verwendet. Also sind z. B. die Begriffe "Leflunomid-Resistenz" und "A77 1726-Resistenz" sinngemäß identisch.

Pyrimidin- und Purinnukleotide spielen eine Schlüsselrolle in biologischen Prozessen. So sind sie als Bausteine von DNA und RNA Träger der genetischen Information. Die Biosynthese der Pyrimidine beinhaltet die irreversible Oxidation des Dihydroorotats zu Orotat, welche durch das Enzym Dihydroorotat Dehydrogenase (DHODH) katalysiert wird. Insgesamt sechs Enzyme werden für die de novo Synthese des Uridin-Mono-Phosphat (UMP) benötigt. UMP spielt eine Schlüsselrolle für die Synthese der anderen Pyrimidine, Cytidin und Thymidin. Die Hemmung der DHODH führt daher zu einer Inhibition der Pyrimidin de novo Synthese. Besonders betroffen sind Immunzellen, die einen sehr hohen Bedarf an Nukleotiden besitzen, aber nur wenig davon durch Seitenwege (salvage pathway) decken können. Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Leflunomid-Analoga identifizierten das Enzym DHODH als möglichen Wirkort A77 1726 und so stellt die Hemmung der DHODH durch Leflunomid einen wichtigen Ansatz zur Erklärung der beobachteten immunmodulierenden Aktivitäten dar.

Um auch andere potentielle intrazelluläre Wirkorte von Leflunomid zu identifizieren, wurde eine Leflunomid-resistente Zelllinie entwickelt (siehe auch Beispiel 1).

Diese Resistenz wurde in einer hoch proliferativen Zelllinie A20.2J (Murine B. Zell Lymphoma) gegenüber A77 1726 induziert. Schrittweise wurde die Konzentration der Substanz in einem serumfreien Kultursystem erhöht, was schließlich zur Etablierung einer stabilen Sublinie namens A20R führte. Die A20R Zelllinie toleriert 30–40mal höhere Leflunomidkonzentrationen als die ursprüngliche Zelllinie A20.2J (ED₅₀ 130 μ M gegenüber 4 μ M).

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß durch eine solche Behandlung einer Leukozytenzelllinie mit steigenden, aber nicht-toxischen Dosen des antiproliferativen Wirkstoffes Leflunomid die Expression einer bislang unbekannten RNA-Helikase stimuliert wird, welche der Zelle vermutlich durch starke Erhöhung der Translationseffizienz ermöglicht, trotz Substanzeinfluß zu proliferieren. Die vorliegende Erfindung hatte daher

zum Gegenstand, diese neue RNA-Helikase durch wirkstoffbedingten Selektionsdruck in einer geeigneten Zelllinie zu generieren, das entsprechende Protein zu identifizieren, monoklonale und polyklonale Antikörper gegen das Gesamtprotein und durch proteolytischen Verdau bzw. Peptidsynthese erhaltene Peptidsequenzen auf herkömmliche und literaturbekannte Art herzustellen, einen Reinigungsprozeß für das funktionelle Enzym zu erarbeiten, das Gen oder Genteilsequenzen dieses Proteins nach herkömmlichen und literaturbekannten Methoden zu identifizieren, zu isolieren und zu klonieren, das Gen oder Genteilsequenzen in einem geeigneten Expressionssystem zu exprimieren und sowohl molekularbiologisch, als auch biochemisch zu charakterisieren.

Durch Bereitstellung dieses Proteins und verwandter RNA-Helikasen können neue anticancerogene, anti-atherosklerotische, immunsuppressive, antiinflammatorische, antivirale, antifungale und antibakterielle Wirkstoffe aufgefunden werden. Diese werden zur effizienten Therapie von einer Fülle von Krankheiten wie z. B. die Alzheimersche Krankheit, Krebs, Rheuma, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akuten und chronischen Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, Diabetes und nach Organtransplantationen dringend benötigt.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Nukleinsäure-bindendes Protein mit Helikase-Eigenschaften, dessen mRNA unter Einfluß von Leflunomid oder ähnlich wirkenden Verbindungen verstärkt exprimiert wird, welches aus einer Säugerzelllinie, vorzugsweise aus einem Abkömmling der murinen Zelllinie A20.2J, stammt, und welches besonders bevorzugt die Aminosäuresequenz gemäß Tabelle 2 oder Teile davon enthält.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die DNA, die für das Nukleinsäurebindende Protein mit Helikase-Eigenschaften oder Teile davon kodiert, insbesondere mit der DNA-Sequenz gemäß Tabelle 2.

Ferner ist ein Gegenstand der Erfindung eine DNA, die unter stringenten Bedingungen, insbesondere bei 68°C in ExpressHyb-Lösung (Clontech) an die DNA-Sequenz gemäß Tabelle 2 oder Teilen davon, hybridisiert.

Darüberhinaus ist Gegenstand der Erfindung ein Vektor, welcher die für das Nukleinsäure-bindende Protein mit Helikase-Eigenschaften kodierende DNA oder Teile davon enthält, und welcher zur Expression besagten Proteins in einer passenden Wirtszelle, die ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist, geeignet ist. Ebenfalls ist ein Antisense-Expressionsvektor Gegenstand der Erfindung, der eine Antisense-RNA exprimiert, die mit der RNA, die aus den oben genannten DNA-Molekülen abgeleitet werden kann, hybridisiert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Herstellung des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften durch Expression des Proteins mittels der erwähnten Vektoren und Wirtszellen und anschließender Isolierung des Proteins mit gängigen Methoden.

Ferner ist ein Gegenstand der Erfindung die Verwendung des Nukleinsäurebindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften, insbesondere des gentechnisch hergestellten, in einem Assay-System zur Auffindung neuer oder Identifizierung bereits bekannter Substanzen in Bezug auf anticancerogene, antiatherosklerotische, immunsuppressive, antiinflammatorische, antivirale, antifungale oder antibakterielle Wirkung zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit, Krebs, Rheuma, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akuter und chronischer Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, Diabetes oder der Folgen einer Organtransplantation.

Das besagte Assaysystem kann so ausgestaltet werden, daß man ausreichende Mengen des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften nach gentechnischen Verfahren exprimiert, das erhaltene Protein kristallisiert, mit gängigen Methoden seine dreidimensionale Struktur aufklärt und dann mit gängigen Methoden des "Molecular Modelling" spezifische Hemmstoffe entwickelt, die vorzugsweise mit dem Nukleinsäure-bindenden Protein mit Helikase-Eigenschaften an dessen ATP-Bindungsstelle, der Substrat-Bindungsstelle oder an einer Stelle wechselwirkt, welche diese funktionellen Epitope beeinflußt. Der Test auf RNA-Helikase-Aktivität kann nach dem Fachmann bekannten Methoden durchgeführt werden, z. B. können synthetische Oligoribonucleotide an eine Matrix fixiert und mit komplementären, markierten Oligoribonukleotiden hybridisiert werden, woraufhin das Nukleinsäure-bindende Protein mit Helikase-Eigenschaften in oder nicht in Gegenwart möglicher Modulatoren seiner Helikase-Aktivität eine bestimmte, meßbare Menge der markierten, nicht-matrixfixierten Oligoribonucleotide freisetzen kann. Ein solcher Assay kann auch auf Mikrotiterplatten durchgeführt werden wodurch mit hoher Effizienz eine große Anzahl möglicher Modulatoren auf ihre Wirkung getestet werden können.

Ein anderer Assay für die RNA-Helikase Wirkung ist eine Resistenzvermittlung gegenüber Leflunomid von ansonsten nicht-Leflunomid-resistenten Zellen durch Expression des rekombinanten Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften, mit anschließender Messung des Einflusses von möglichen Modulatoren des Proteins auf die Überlebensfähigkeit solcher resistent gemachter Zellen in Leflunomid-haltigem Kulturmedium.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des Nukleinsäurebindenden Proteins zur Isolierung spezifisch an dieses Protein bindender RNA's oder zur Ermittlung ihrer Oligoribonukleotidsequenz, vorzugsweise indem man besagtes Protein oder Teile davon an eine Matrix koppelt und die so hergestellte Affinitätsmatrix zur Anreicherung von RNA's, die spezifisch an das gekoppelte Protein oder Teile davon binden, aus RNA-Gemischen benutzt und besonders bevorzugt indem man noch zusätzlich die so angereicherten RNA-Moleküle mit PCR-Linkern versieht, eine PCR-Anreicherung durchführt und die so erhaltenen PCR-Fragmente analysiert.

Unter Hybridisierung unter stringenten Bedingungen wird in der vorliegenden Anmeldung Hybridisierung bei 68°C, ExpressHyb-Lösung (Clontech) verstanden. Das anschließende Waschen erfolgt wie in Beispiel 6 angegeben.

Ein Expressionsvektor zu einer passenden Wirtszelle ist ein Vektor, der in der entsprechenden Wirtszelle zur heterologen Genexpression und zur Replikation (beides mit hoher Effizienz) befähigt ist, und zwar konstitutiv oder nach Induktion durch gängige Methoden.

Ein Antisense-Expressionsvektor ist ein Vektor, der in einer entsprechenden Wirtszelle (s. o.) eine gewünschte Antisense-RNA exprimiert, und zwar entweder konstitutiv oder nach Induktion durch gängige Methoden.

Die Erfindung wird nun anhand der Figuren, Tabellen und Beispiele näher erläutert, ohne darauf beschränkt zu sein.

Die Figuren und Tabellen sind wie folgt beschrieben:

Figurenlegenden:

5 **Fig. 1** SDS-PAGE (12% Acrylamid). Die linken drei Gelspuren sind von einem Coomassie-Blau gefärbten Gel, die drei rechten Gelspuren von einem Silber gefärbten Gel. M: Marker (Combithek von Boehringer Mannheim); A20.2J: normale A20-Zellen; A20R: A20-Zellen, die gegen 100 µM Leflunomid resistent sind. Beim Coomassie-Blau gefärbten Gel worden pro Geltasche jeweils 100 µg Protein, beim Silber gefärbten Gel jeweils 5 µg Protein aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet das Protein, das bei resistenten A20-Zellen verstärkt exprimiert wird.

10 **Fig. 2** Peptidtrennung durch HPLC. Die HPLC wurde nach den unter Beispiel 1f angegebenen Bedingungen durchgeführt. Im Elutionsprofil sind die 6 Peaks, welche den Peptiden 1–6 des Beispiels 1g entsprechen, fortlaufend durchnummeriert. Auf der Y-Achse sind relative Absorptionseinheiten bei einer Wellenlänge von 206 nm, auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten angegeben.

15 **Fig. 3 (A)** Zeitlicher Verlauf der Expression der putativen RNA-Helikase unter dem Einfluß von Leflunomid bei normalen A20.2J-Zellen im Vergleich zu Leflunomid-resistenten A20R-Zellen. Die Hybridisierung wurde mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde A20-5/-6b durchgeführt, deren Sequenz die konservierten Bereiche der DEAD-Box-Protein-DEAH-Subfamilie der putativen RNA-Helikase enthält. Als Molekulargewichtsmarkierung wurde der RNA-Längenstandard I von Boehringer Mannheim verwendet. In der 1. Spur ist die A20R-Gesamt-RNA, in der 2. Spur A20.2J-Gesamt-RNA ohne Behandlung der entsprechenden Zellen mit A77 1726, in der 3.–6. Spur jeweils A20.2J-Gesamt-RNA mit unterschiedlich langer Inkubation der entsprechenden Zellen mit 5 µM A77 1726 (1 Stunde, 8 Stunden, 16 Stunden, 24 Stunden) aufgetragen. Es wurden von jedem Ansatz 20 µg Gesamt-RNA aufgetragen. In Teil (B) ist der gleiche Blot wie unter (A) mit einer β-Actin Probe zur Kontrolle hybridisiert worden.

25 **Fig. 4 (A)** Northern-Experiment zur Expression der putativen RNA-Helikase bei Absetzung von Leflunomid bei Leflunomid-resistenten A20R-Zellen. Die Kontrolle war die RNA von A20R-Zellen, die mit 100 µM Leflunomid inkubiert worden waren (Spur 1). Hybridisiert wurde mit der DNA-Sonde A20-5/6b. Die Spuren 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 enthielten jeweils 15 µg Gesamt-RNA von A20R-Zellen die ohne Leflunomid über die Zeiträume 1, 2, 3, 4, 5, 14 Tage und 5 Monate inkubiert worden waren. (B) Kontrollhybridisierung des gleichen Blots mit einer β-Actin Probe. Die Blots sind immer mit der entsprechenden quantitativen Auswertung gezeigt.

30 **Fig. 5** Northern-Blot mit ca. 2 µg Poly (A) RNA pro Spur von acht verschiedenen humanen Geweben. Die Spuren 1–8 enthalten von links nach rechts Gewebe von Herz, Gehirn, Placenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, und Pankreas. Die RNA wurde auf einem denaturierenden 1,2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, und dann auf eine positiv geladene Nylonmembran gebロットet, danach durch UV-Quervernetzung fixiert. Hybridisiert wurde mit der A20-5/6b-DNA-Sonde. Die entsprechende quantitative Auswertung ist unter dem Blot gezeigt.

35 **Tabelle 1:** Primerkonstruktion aus einem Teilbereich des vermehrt exprimierten 135 kDa-Proteins aus A20R. Die jeweils obere Buchstabenreihen kennzeichnen die Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code, darunter ist die Nukleotidsequenz angegeben. Die in Klammern geschriebenen Aminosäuresequenzen sind beginnend mit ihren C-terminalen Ende aufgeführt und leiten sich von DNA-Sequenzen ab, die komplementär zu den hier angegebenen Primersequenzen sind. Es ist jeweils der degenerierte genetische Code angegeben. Da die dritte Base des Codons häufig nicht eindeutig ist, wurde, um in jedem Falle die zugehörige Base für die entsprechende AS zu erhalten, ein Gemisch aller in Frage kommenden Basen synthetisiert. N ist die Abkürzung für alle vier Basen (G, A, T, C). I ist die Abkürzung für Inosin, welches Basenpaarungen sowohl mit Purin- als auch Pyrimidinbasen eingeht. R = A, G; Y = T, C; S = G, C.

45 Bei A20-2, A20-3, A20-4 und A20-5 handelt es sich um stromaufwärts gelegene, degenerierte Primer. A20-6a und A20-6b sind stromabwärts gelegene Primer. Der mittlere Abstand der stromauf- und stromabwärts gelegenen Primer zueinander beträgt etwa 600 Nukleotide. Bei dem unter 6 angegebenen Primer A-20-6b wurde versehentlich das 16. Nukleotid gleich N gesetzt, so daß hier im entsprechenden komplementären Strang sowohl für Isoleucin (ATT, ATC, ATA) als auch für Methionin (ATG) kodiert wird. Diese Tatsache berührte nicht den Erfolg der durchgeführten PCR, jedoch erscheint auf diese Weise fälschlicherweise ein Methionin als sechstletzte Aminosäure in der Sequenz gemäß Tabelle 2 und nicht das korrekte Isoleucin.

50 **Tabelle 2:** Sequenzierung des Teilbereichs der putativen RNA-Helikase von Leflunomid-resistenten A20R-Zellen. Unterhalb der Basensequenz (1–612) ist die entsprechende Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode angegeben. Korrekt ist als sechstletzte Aminosäure Isoleucin und nicht Methionin; Erklärung siehe Figurenlegende zu Tabelle 1. Das gezeigte DNA-Fragment wurde als A20-5/-6b Sonde für die Hybridisierungsexperimente verwendet.

Beispiel 1: Herstellung der Leflunomid-resistenten Zellen

60 **Medium:**

Die Kultivierung der Ausgangslinie, die Züchtung der resistenten Sublinie A20R sowie die Proliferationstests zur Überprüfung der Kreuzresistenz der A20R-Zellen wurden in einem selbsthergestellten, serumfreien Medium vorgenommen. Trockenmedium für 10 Liter Iscove-Medium (Biochrom, Berlin) wurde in 10 Liter bidest. gelöst. Der Lösung wurden anschließend:

65 18,95 g NaCl
11,43 g NaHCO₃
700 mg KCl

10 ml 35%ige NaOH-Lösung
0,5 ml 1 molare Mercaptoethanol-Lösung

zugegeben und das Medium sterilfiltriert (alle Substanzen von Riedel de Häen). Vor Gebrauch wurde einem Liter Iscove Medium:

32 mg humanes holo-Transferrin
1 g bovines Albumin
1,5 ml Lipide

(alle Substanzen von Sigma) zugegeben.

Beschreibung der Ausgangslinie A20.2J:

A20.2J ist eine Sublinie des Maus B-Zellymphomes A20 (ATCC TIB-208) und als Fusionslinie bei der ATCC beschrieben für die Zelllinie LS 102.9 (ATCC HB-97). Die Zellen zeichneten sich durch eine hohe Proliferation (Verdopplungszeit ca. 10 Stunden) und einer hohen Sensitivität (50% Hemmung der Proliferation der Zellen bei 2 µM Substanz) gegenüber A77 1726 (dem Hauptmetaboliten von Leflunomid) aus. Als nichtadhärent wachsende Zelllinie waren die Zellen leicht zu kultivieren.

Beschreibung der Resistenzzüchtung:

A20.2J Zellen wurden anfangs für 5 Tage in Iscove-Medium mit 1 µM A77 1726 kultiviert (Konzentration unterhalb der 50% Hemmung der Proliferation) und das Zellwachstum sowie die Vitalität der Zellen überprüft. Jeden 2. bzw. 3. Tag wurden die Zellen in frisches Medium passagiert, dem die gleiche Konzentration A77 1726 zugegeben war. War nach 5 Tagen Kultivierung ein Wachstum der Zellen und keine hohe Absterberate (maximal 30% tote Zellen) erkennbar, so wurde die Konzentration an A77 1726 schrittweise erhöht. Stagnierte die Proliferation der Zellen, so wurde die Konzentration der letzten Passage verwendet. Nach einem Jahr Kultivierung war eine stabile, resistente Sublinie A20R etabliert, die in Gegenwart von 100 µM A77 1726 konstante Proliferation und morphologisch keine Unterschiede zur Ausgangslinie A20.2J zeigte.

Proliferationsnachweis:

5 · 10⁵ Zellen wurden in 5 ml Iscove-Medium in 6-well-Platten (Greiner) für 48 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert.

Ein well wurde als positiver Bezugswert angesetzt:

- Für die A20.2J: Zellen in Iscove-Medium
- für die A20R: Zellen in Iscove-Medium + 100 µM A77 1726

Zu den Zellen der restlichen wells wurden Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen pipettiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen im well resuspendiert, 100 µl Zellsuspension entnommen und in 1%iger Eosinlösung (1 g Eosin yellowish von Riedel de Häen in 100 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung gelöst) verdünnt. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und der Anteil der toten Zellen (durch Eosin angefärbt) ermittelt. Die substanzinduzierte Veränderung der Proliferation wurde zur jeweiligen Positivkontrolle berechnet.

Test 2:

4 · 10³ Zellen wurden in einem Volumen von 100 µl Iscove-Medium in 96-well-Rundbodenmikrotiterplatten (Nunc) pipettiert. Testsubstanzen wurden von der gewünschten Testkonzentration ausgehend doppelt konzentriert angesetzt und 100 µl dieser Lösung zu den Zellen pipettiert. Die Platten wurden für 48 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Die Proliferation wurde durch radioaktive Markierung der DNA sich teilender Zellen bestimmt. Dazu wurde nach der Inkubationszeit jedem well 25 µl ³H-Thymidin (10 µCi/ml; spezifische Aktivität 29 Ci/mMol; Fa. Amersham) zugegeben und für weitere 16 Stunden inkubiert. Zur Auswertung des Testes wurden die Platten über ein Zellerntegerät (Skatron) auf Glasfaserfilter (Pharmacia) geerntet, wobei nicht eingebautes ³H-Thymidin in gesonderten Abfallflaschen aufgefangen, und nur zellulär, DNA-gebundene Radioaktivität gemessen wurde. Die Filter wurden in Plastiktaschen verschweißt und nach Zugabe von 10 ml Szintillator (Pharmacia) in Zählkassetten zur Messung verschlossen. Die Messung erfolgte in einem Beta-Counter (Beta-Plate-System 1206 der Firma Wallac). Wie unter Test 1 angegeben wurde die Proliferationsänderung der Testsubstanzen gegen die jeweiligen Positivkontrollen berechnet.

Beispiel 2: Test der Resistenz der A20R-Zellen

1. Kreuzresistenz gegen literaturbekannte antiproliferative Substanzen:

Diverse literaturbekannte antiproliferative Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen (wie in Proliferationstest 2 beschrieben) auf ihre antiproliferative Eigenschaft auf A20R-Zellen und A20.2J getestet. In der nachfolgenden Tabelle wird die berechnete Hemmung einer Konzentration dieser Substanzen auf beide Zelllinien dargestellt. Im Vergleich zur Ausgangslinie A20.2J sollte dargestellt werden, ob bei den A20R-Zellen eine generell höhere Resistenz gegenüber antiproliferativen Substanzen vorlag.

	Testsubstanzen		% Hemmung der	% Hemmung der
			A20.2J	A20R
5	M thotrexat	(0,15 μ M)	75,9	65,2
	Cisplatin	(10 μ M)	44,7	91,1
10	Cyclosporin A	(0,25 μ M)	69,9	77,5
	Mycophenolsäure	(0,15 μ M)	89,8	76,8

15 2. Kreuzresistenz gegen strukturverwandte, A77 1726 — ähnliche Substanzen:

Da keine generelle Resistenz der A20R-Zellen gegen antiproliferative Substanzen vorlag, sollte überprüft werden, ob strukturverwandte Analoga von A77 1726 die gleiche proliferationshemmende Eigenschaft auf A20R-Zellen besitzen, wie auf A20.2J-Zellen. Die Untersuchung wurde mittels Proliferationstest 1 durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle sind vergleichend IC-50-Werte (die Konzentration einer Substanz, welche die Proliferation der Zellen um 50% hemmt) aufgeführt.

	Testsubstanzen	IC-50 Wert der	IC-50-Wert der
		A20.2J	A20R
25	A77 1726	2-3 μ M	130 μ M
	X92 0715	8 μ M	120 μ M
30	X91 0279	10 μ M	120 μ M
	X91 0325	10 μ M	75 μ M

35 A20R-Zellen zeigen eine graduell abnehmende Kreuzresistenz zu strukturverwandten A77 1726B-Analoga, was auf eine strukturspezifische Resistenz schließen läßt.

3. Kreuzresistenz der A20R-Zellen gegen Brequinar:

Vorausgegangene Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Leflunomid deuteten auf Parallelen zu Brequinar (Dupont-Merck) hin. Aus diesem Grund wurde Brequinar in die Untersuchungen zur Kreuzresistenz der A20R mit einbezogen.

40 Ermittelt wurden die IC-50-Werte der A20.2J und A20R-Zellen gegenüber des Brequinar-Natriumsalzes mit Hilfe des Proliferationstestes 1.

	IC-50-Wert der A20.2J	IC-50-Wert der A20R
45 Brequinar-Na ⁺ -	0,2 μ M	50-75 μ M
50 Salz		

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß A20R-Zellen bezüglich ihres Wachstumsverhaltens eine Kreuzresistenz gegen Analoga von A77 1726 und Brequinar, einer Substanz, welche die DHODH hemmt, zeigen.

55 Beispiel 3: Untersuchung von A20R-Zellen auf MDR-Proteine

Gelelektrophoretische Auftrennungen der zellulären Proteine der A20.2J und A20R-Zellen zeigten, daß ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 135 kDa (ermittelt mit Proteineichmarkern) in der resistenten Linie überexprimiert wurde (siehe auch Fig. 1). Die erste Vermutung war, daß es sich dabei um ein MDR (Multi-Drug-Resistance) Phänomen handelt.

MDR (Multi-Drug-Resistance) ist definiert als eine Resistenz der Zellen gegen strukturell nicht verwandte antineoplastische Substanzen. Tumorzellen reagieren durch Überexpression eines Plasmamembranglycoproteins, das ATP-abhängig zelltoxische Substanzen aus der Zelle herauspumpen kann. Durch Überexpression dieser MDR-Proteine (135—180 KD) überleben die Zellen auch in höheren Konzentrationen von antiproliferativen Substanzen.

65 MDR-Proteine können durch Calciumkanalblocker in ihrer Funktion als Ausschlebungspumpen gehemmt werden, was zu einer Anhäufung der Substanz in der Zelle führt. Zu beiden Zelllinien wurden deshalb literaturbekannte Calciumkanalblocker und ebenfalls MDR-assoziierte Substanzen zugegeben um zu überprüfen, ob die

resistente Linie MDR-Proteine überexprimiert. Als Calciumkanalblocker wurde Verapamil, als MDR-Substrate Daunorubicin und Doxorubicin verwendet. Die Ergebnisse sind unten tabellarisch als % Hemmung der Proliferation dargestellt und wurden mit Hilfe von Test 2 ermittelt.

Verapamil (nM)	Zugabe von 300 nM Daunorubicin		Zugabe von 300 nM Doxorubicin	
	A.20.2 J	A20R	A20.2 J	A20R
0	10,7 %	6,8 %	2,7 %	9,1 %
100	33,4 %	20,7 %	19,9 %	24,9 %
200	49,6 %	31,7 %	30,4 %	48,7 %
400	54,0 %	42,4 %	40,4 %	47,3 %

Beide Zelllinien werden durch die beiden Substanzen in gleichem Maße gehemmt. Die Resistenzen A20R-Zellen zeigen keine höhere Akzeptanz durch erhöhte MDR-Expression.

Der gleiche Versuchsansatz wurde gewählt um zu überprüfen, ob A77 1726 ein MDR-transportiertes Molekül ist.

Verapamil (nM)	A20.2J + 1,6 μ M A77 1726	A20R + 62,5 μ M A77 1726
0	16,4 %	10,3 %
100	14,3 %	6,4 %
200	12,5 %	9,9 %
400	7,9 %	13,9 %

Bei den Zelllinien konnte festgestellt werden, daß A77 1726 nicht von MDR-Proteinen transportiert wird.

Beispiel 4: Mikropräparative Reinigung eines 135 kD Proteins

a.) Probenvorbereitung für Proteinbestimmung

a.1) Proteinbestimmung nach Popov (Popov et al.: Acta Biol. Med. Germ. 34, S.1441 – 1461)

Prinzip: Verdünnte Proteinlösungen werden mit Amidoschwarz/Methanol/Essigsäure als gefärbtes Pellet ausgefällt, gewaschen, in 0,1 M NaOH aufgenommen und die Extinktion bei 620 nm gemessen.

Die Berechnung des Proteingehalts erfolgt anhand einer Eichkurve mit BSA-Lösungen (BSA = Rinder-Serum-Albumin).

Anmerkung: Diese Proteinbestimmung wird nicht beeinflusst von Detergenzien (SDS, Nonidet, etc.), ebenso stört die Anwesenheit von β -Mercaptoethanol nicht. Es sollten Original Eppendorf®-Gefäße benutzt werden, da die Haftung des Pellets an der Kunststoffoberfläche stark ist und somit Protein-Verluste durch Ablösen des Pellets beim Abgießen der Waschlösungen vermieden werden.

Folgende Lösungen werden benötigt:

"Lösung Popov 1":

0,65 g Amidoschwarz

K 50 ml Popov 2 mind. 1 h rühren, nur eine Woche haltbar.

"Lösung Popov 2":

50 ml Eisessig

K 450 ml Methanol

"Lösung Popov 3":

4 ml Popov 1

K 36 ml Popov 2, anschl. filtrieren

Erstellung der Eichkurve:

Ansetzen der BSA-Lösung: Rinder-Albumin, v. Sigma, 98 bis 99%ig wird in einer Konzentration von 1 mg/ml in 5%iger SDS-Lösung angesetzt. Es wird eine größere Menge Lösung hergestellt, die in 1 ml-Portionen bei -25°C gelagert wird. Eine 1 ml-Portion wird aufgetaut und anschließend 10 Minuten bei 95°C im Thermomixer (Eppendorf Thermomixer 5436) kräftig geschüttelt.

Nach dem Abkühlen werden folgende Verdünnungen vorgenommen:

	10 µl BSA-Lösg.	K	990 µl 5 %ige SDS-Lösg.		0,010 mg BSA/ml
10	25	"	K 975	"	0,025
	50	"	K 950	"	0,050
15	75	"	K 925	"	0,075
	100	"	K 900	"	0,100
	150	"	K 850	"	0,150
20	200	"	K 800	"	0,200
	ohne	"	K 1000	"	Blindwert

Von allen 8 Lösungen werden jeweils zweimal 200 µl (Doppelbestimmung) entnommen, mit 600 µl "Popov 3" versetzt, anschließend kurz und kräftig vermischt (Vortex).

Dann: 5 Minuten zentrifugieren mit 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf), der Überstand wird verworfen. Anschließend wird das Pellet 3mal mit je 750 µl "Popov 2" gewaschen und abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschgang wird das Pellet in 1 ml 0,1 M NaOH aufgenommen und in einer Kunststoffküvette (d = 1 cm) gegen den Blindwert bei 620 nm die Extinktion gemessen (Spektralphotometer der Fa. Kontron).

Beispiel für eine Meßreihe:

Konzentration BSA (mg/ml)	Extinktion bei 620 nm
0	0
0,010	0,0459
0,025	0,1154
0,050	0,2442
0,075	0,4025
0,100	0,4964
0,150	0,6856
0,200	0,9534

Der Korrelationskoeffizient bei der Auswertung: Proteinkonzentration/Extinktion beträgt erfahrungsgemäß 0,995–0,999 (bei diesem Beispiel bei 0,998)

a.2) Probenvorbereitung/Proteinbestimmung der A20-Zellen:

10⁷ A20-Zellen (der Begriff A20-Zellen bedeutet A20.2J und A20R), vorliegend in 1 ml PBS-Puffer, werden innerhalb 5 bis 10 Sekunden mit 10⁴ rpm in der Tischzentrifuge (Eppendorf-Modell 5415 C) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird mit 1 ml 5% SDS-Lösung versetzt, mit einer Pipette mehrmals aufgesaugt und damit homogenisiert und 10 Minuten bei ca. 95°C im Thermomixer kräftig geschüttelt und anschließend abgekühlt.

Von dieser Lösung werden:

20 µl mit 980 µl 5% SDS-Lösung → 50fache Verdünnung sowie 50 µl 950 µl 5% SDS-Lösung → 20fache Verdünnung versetzt und 10 Minuten bei 95°C im Thermomixer kräftig geschüttelt und abgekühlt. Anschließend werden von jeder Lösung für Doppelbestimmungen zweimal 200 µl entnommen, mit 600 µl "Popov 3" versetzt und so wie oben für BSA beschrieben weiterbehandelt. Die Auswertung erfolgt anhand der bereits beschriebenen Eichkurve.

Erhalten Meßwerte:

Verdünnung	Extinktion bei 620nm	-Proteinkonz. × Verdünnungsfaktor (mg/ml)
50fach	0,0972	0,915
20fach	0,1800	0,720

Ergebnis: A20-Zellen enthalten ca. 800 µg Protein.

b.) Probenvorbereitung für SDS-PAGE

10⁷ A20-Zellen, vorliegend in 1 ml PBS-Puffer, werden innerhalb 5 bis 10 Sekunden mit 10⁴ rpm in der Tischzentrifuge (Eppendorf-Modell 5415 C) zentrifugiert.

b.1) Direkte Lyse

Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird mit 400 µl Probenpuffer versetzt und durch mehrfaches Ansaugen mit der Pipette homogenisiert, kräftig geschüttelt (Vortex-Schüttler) und für 5 bis 10 Minuten bei 95°C im o.g. Thermoschüttler oder Wasserbad bewegt. Die Proteinkonzentration dieser hochviskosen Lösung beträgt ca. 2 mg/ml. Für ein Coomassie-gefärbtes Gel werden von dieser Lösung 40 bis 50 µl/Probentasche, entsprechend 80 bis 100 µg Protein, benötigt. Für Ag-gefärbte Gele wird die beschriebene Lösung anschließend noch 1 : 20 verdünnt, 40 bis 50 µl entsprechen damit einer Proteinkonzentration von 4 bis 5 µg/Probentasche.

Zusammensetzung des Probenpuffers:

Millipore-H ₂ O	2,7 ml
Glycerin, 98%ig	10,0 ml
0,25M Tris / 1M Glycin	9,0 ml
25% SDS-Lsg.	6,8 ml
0,1 % Bromphenolblaulsg.	2,5 ml
2-Mercaptoethanol	4,0 ml

b.2) Einfrieren der Zellen und anschließende Lyse

Das Zellpellet wird sofort im verschlossenen Eppendorf-Gefäß für ca. 1 Minute in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -80°C aufbewahrt. Beim Lysieren wird der Probenpuffer direkt auf das tiefgekühlte Zellpellet gegeben.

c.) SDS-PAGE

Es wurden verschiedene Polyacrylamid-Gele verwendet (10%, 12%, 4 bis 22,5% PAA). Beste Ergebnisse hinsichtlich Bandenschärfe wurden mit Gradientengelen erhalten, deren PAA-Gehalt bei 4 bis 10% lag. Die hierfür benötigten Techniken/Lösungen werden nachfolgend beschrieben:

Trenngel

Zusammensetzung der Gellösungen für Gradientengel 4 bis 10% AA für ein Gel (ca. 24 ml):

Komponente	4 % AA-Lsg.	10 % AA-Lsg.
H ₂ O	7 ml	-
Glycerin	-	6,1 g
Stammlsg. 1	1,6 ml	4 ml
3M Tris, pH 8,8	3 ml	3 ml
10% APS	80 µl	40 µl
10% SDS	120 µl	120 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Stammlösung 1 : 30% Acrylamid / 0,5% N,N'-Methylenbisacrylamid crosslinking: 1,7%

APS: Ammoniumpersulfat

Sammelgel

Zusammensetzung der Gellösung mit 3,8% AA für zwei Gele (ca. 10,5 ml)

Komponente	
H ₂ O	3,7 ml
Stammlsg.2	4,0 ml
0,5M Tris, pH 6,8	2,5 ml
10 % APS	200 µl
10 % SDS	100 µl
TEMED	12 µl

Das Gel wird nach bekannten Standardmethoden gegossen und nach ausreichender Polymerisierung in einer Vertikal-Elektrophorese-Kammer fixiert. Für ein Coomassie-/Silber gefärbtes Gel werden von der unter b) beschriebenen A20-Probe je 40 µl = 80 µg/4 µg Protein pro Probentasche eingefüllt.

Als Molekulargewichtsstandard dienen "Combithek"-Marker von Boehringer Mannheim, dessen Molekulargewichtsbereich im reduzierenden Probenpuffer von 170 bis 14 kD reicht.

Zusammensetzung des Elektrophorese-Laufpuffers:
gebrauchsfertige Verdünnung mit Milli Q-H₂O

SDS 0,1%

Tris 50 mM

Glycin 200 mM

Strombedingungen: ca. 5 Stunden bei 35mA/Gel (Spannung 400 V) bei Verwendung eines mit den Maßen 17 × 18 × 0,1 cm.

Färbungen:

1. Coomassie-Färbung

Reihenfolge	Zeit	Zusammensetzung der Lösung
Fixieren / Färben	20-30 min	0,2 % Coomassie Brilliant-Blue R 250 in 50 % Methanol / 10 % Essigsäure / 40 % H ₂ O
Entfärben	beliebig, Lsg. mehrfach wechseln	20 % i-Propanol, 7 % Essigsäure, 3 % Glycerin, 70 % H ₂ O

2. Ag-Färbung (abgewandelte Heukeskoven-Färbung)

Reihenfolge	Zeit	Zusammensetzung der Lösung
Fixieren	30 min	40%Ethanol, 10%Essigsre., 50%H ₂ O
Inkubieren	2-24 h	0,40 g Natriumthiosulfat * 5 H ₂ O + 5,00 g Natriumacetat + 60 ml Ethanol kurz vor Gebrauch: + 1,0 ml Glutardialdehyd (25%ig) mit H ₂ O auf 200 ml auffüllen
Waschen	3 x 5-10 min	H ₂ O

Färben	45 min	200 mg Silbernitrat kurz vor Gebrauch: + 40 µl Formaldehydls., 35%ig mit H ₂ O auf 200 ml auffüllen
Waschen	10 sek	H ₂ O
Entwickeln	2-10 min	5 g Natriumkarbonat kurz vor Gebrauch: + 20 µl Formaldehyd, ca. 35%ig mit H ₂ O auf 200 ml auffüllen
Stoppen	10 min	1,5%ige Na ₂ EDTA * 2H ₂ O

Alle o.g. Schritte werden in leichter Bewegung (Schütteltisch) in jeweils 200 ml/Gel durchgeführt.
Vor dem Fotografieren/Scannen/Trocknen oder Einschweißen in Plastikbeutel wird das Gel mehrere Stunden bis über Nacht in bidest. H₂O inkubiert.
Aufbewahrung: die eingeschweißten Gele werden bei Raumtemperatur bzw. in einem Kühlschrank (T: > 0°C) übereinandergestapelt aufbewahrt, möglichst lichtgeschützt.

Auswertung/Beurteilung der Gele

Im hochmolekularen Bereich (zwischen Markerbande 170 und 116 kD) kann eine Proteinbande erkannt werden, die bei resistenten A20-Zellen viel stärker exprimiert wird. Dies kann sowohl bei Coomassie- als auch bei Silberfärbung beobachtet werden (siehe Fig. 1).

Aussage zum Molekulargewicht

Von den acht Kallibrierstandards wurde die Laufstrecke der einzelnen Proteine im 4 bis 10%-Gel im Verhältnis zum Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen. Von der oben erwähnten Proteinbande mit bekannter Laufstrecke konnte somit das Molekulargewicht errechnet werden. Die gesamte Laufstrecke betrug 11,2 cm.

Proteinbez der Combithek-Marker	M_r (D)/log M_r	Laufstrecke (cm)	R_f -Wert
α_2 -Macroglobulin (Pferdeplasma)	170000/5,230	4,37	0,39
β -Galactosidase (E.coli)	116353/5,066	5,78	0,516
Fructose-6-phosphat-Kinase (Kaninchenmuskel)	85204/4,930	7,20	0,643
Glutamat-Dehydrogenase (Rinderleber)	55562/4,745	8,35	0,746
Aldolase (Kaninchenmuskel)	39212/4,593	9,17	0,819
Triosephosphat-Isomerase (Kaninchenmuskel)	26626/4,425	10,00	0,893
Trypsin-Inhibitor (Sojabohnen)	20100/4,303	10,33	0,922
Lysozym (Hühnereiweiß)	14307/4,156	10,63	0,949
unbekanntes Protein, 5 Auftragungen	?	5,58-5,65 (5,60)	0,500

Der Mittelwert der 5 Auftragswerte des unbekannten Proteins ist in Klammern angegeben. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,977. Das errechnete Molekulargewicht beträgt M_r 135 kDa.

Densitometrische Auswertung zur Mengenangabe

Am Bio Image®-System (Fa. Millipore, Eschborn) wurde im "whole band-menu" eine Quantifizierung der Banden eines Coomassie-gefärbten PAA-Gels (4 bis 10%) mit resistenten A20-Zellen (A20R) vorgenommen. Ergebnis bei 5 ausgewerteten Bahnen mit unterschiedlichem Proteingehalt:

Gesamtproteinmenge (μ g)	IOD = integrierte optische Dichte, (%) der 135kD Proteinbande
80	1,07
80	1,03
60	1,05
60	1,04
40	1,32

Demnach beträgt der Anteil des 135 kD-Proteins in resistenten A20-Zellen ca. 1%. Bei normalen A20-Zellen (A20.2 J) konnte bei Auftagung von 80 μ g Protein diese Bande nicht quantitativ erfaßt werden, da sie im Vergleich zu den resistenten Zellen nur sehr schwach erkennbar ist.

Sonstige Informationen, die mit der SDS-PAGE erhalten werden: Bei einer Probenaufarbeitung wurde der unter a) beschriebene Probenpuffer verändert, indem kein Mercaptoethanol zugesetzt wurde. Unter dieser Bedingung spalten sich die Proteine nicht in Untereinheiten auf, die durch S-S-Brücken gebildet werden.

Ergebnis: Es kam zu keiner Veränderung des Molekulargewichtes des 135kD-Proteins.

d.) Mikropräparative Anreicherung des 135 kDa-Proteins

Die zur Sequenzierung benötigte Proteinmenge wird im allgemeinen mit 100 pMol angegeben, das entspricht ca. 14 μ g Protein. Bei vorsichtiger Schätzung (im Vergleich zur Konzentration der Marker) wurde die Konzentration des 135kDa-Proteins bei einer 80 μ g-Gesamtauftragung auf 0,3 μ g geschätzt. Es wurden 16 Gele (PAA 4 bis 10%) mit insgesamt 104 der 135 kDa Banden hergestellt.

Die aufgetragene Gesamtproteinmenge betrug stets 80 μ g.

e.) Proteaseverdau im Polyacrylamidgel

Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurden die Gelbanden ausgeschnitten und innerhalb eines Tages durch mehrmaliges Wechseln des H₂O neutralgewaschen. Die Gelstücke wurden anschließend durch ein 32 µm-Sieb (in einer Spritze ohne Kanüle) gedrückt. Die feine Gelpaste wurde anschließend in einer Vakuum-

zentrifuge bis fast zur Trockene eingedampft. Danach erfolgte die Zugabe von Enzym/Puffer; es wurde Endoprotease LYS-C (Boehringer Mannheim) in 10fachem Überschuß zugegeben. Es wurde 6 bis 7 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend für mehrere Stunden mit 1 ml: 60% Acetonitril/0,1% TFA, bei 37°C eluiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Elution über Nacht bei Raumtemperatur wiederholt. Der Überstand wurde nun abpipettiert, mit dem ersten Überstand vereinigt, durch einen 0,02 µm Filter (Anatop® von Merck) wiederholt filtriert und in einer Vakuum-

zentrifuge eingedampft. Vor dem Einspritzen in die HPLC wird mit 10–20% Ameisensäure verdünnt.

f.) Peptidtrennung in der HPLC

Meßbedingungen:

Säule	:	Superspher® 60 RP Select B	20
Laufmittel A	:	0,1 % TFA (Trifluoressigsäure) in H ₂ O	
Laufmittel B	:	0,1 % TFA in Acetonitril	
Gradient	:	t [min] % B	25
		0 0	
		60 60	30
		65 70	
Fluß	:	0,3 ml/min	35
Meßwellenlänge	:	206 nm	

Das Ergebnis ist in Figur 2 gezeigt.

g.) Automatische N-terminale Proteinsequenzanalyse nach Edmann (Beckmann Analyzer)

Peptid 1: KLG D1 MGVK KE (SEQ ID NO:1)
 Peptid 2: KLG D1 MGVK KETFPDK (SEQ ID NO:2)
 Peptid 3: KLIVTSATMDA E K (SEQ ID NO:3)
 Peptid 4: DATSDLAILARK (SEQ ID NO:4)
 Peptid 5: KIFQ K (SEQ ID NO:5)
 Peptid 6: TPQ EDYV E AAV (SEQ ID NO:6)

Die den Peptiden 1 bis 6 entsprechenden Peaks sind in Fig. 2 markiert.

h.) Datenbankvergleich mit bekannten Proteinsequenzen

Die erhaltenen Peptidsequenzen zeigten teilweise starke Homologie zu einem von der Gensequenz abgeleiteten Protein aus *Caenorhabditis Elegans*, dessen Funktion unbekannt ist. Die mit dieser Sequenz nicht übereinstimmenden Aminosäuren sind markiert (siehe Abschnitt g.). Die außerordentlich starke Homologie von Peptid 3 (aus der Literatur ist bekannt, daß diese SAT-Box in DEAD-Box-Proteinen von Bakterien bis Säugern stark konserviert ist) mit der *C. elegans*-Sequenz und die fehlende bzw. schwache Übereinstimmung mit Peptid 4 bzw. Peptid 2 sind ein klarer Beweis dafür, daß das erfindungsgemäße Protein ein neuer Vertreter aus der Klasse der DEAD-Box Proteine ist.

Die folgenden Beispiele beschreiben durchgeführte molekularbiologische Experimente. Dabei werden grundlegende molekularbiologische Standardmethoden, die z. B. in "Molecular Cloning — A Laboratory Manual", 2. Auflage von Sambrook et al., erscheinen bei Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben sind, als bekannt vorausgesetzt. Solche Techniken sind z. B. Präparation von Plasmid-DNA, Plasmid-Minipräparation, Plasmid-Maxipräparation, Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Elution durch Filtration, Elution durch Adsorption, Enzymatische Modifikation von DNA, Verdau der DNA durch Restriktionsendonukleasen, Transformation von *E. coli*, Präparation von RNA, RNA-Präparation mit der Einzelschritt-Methode (nach Chomzynski), mRNA-Präparation mit Dynabeads®, RNA-Gelelektrophorese, Northern-Blot, Radioaktive Markierung von

DNA, "Random primed" DNA-Markierung mit [α - 32 P]dATP, Sequenzierung von DNA nach der Didesoxymethode, cDNA-Herstellung aus Gesamt-RNA, Nicht-radioaktive Markierung von Nukleinsäure, "Random primed" DNA-Markierung mit Digoxigenin (DIG), Nachweis der DIG-markierten Nukleinsäuren.

5

Beispiel 5

PCR-Anreicherung eines cDNA Fragments entsprechend den gefundenen Aminosäuresequenzen.

Die Reaktionen wurden in einem Perkin Elmer Cycler durchgeführt. Für einen 50 μ l PCR-Standardansatz wurden folgende Komponenten auf Eis zusammenpipettiert und mit 50 μ l Mineralöl überschichtet:

10

- 1 μ l Template-DNS (0,5–2,5 ng)
- 1 μ l Vorwärtsprimer (30 pmol/ μ l)
- 1 μ l Rückwärtsprimer (30 pmol/ μ l)
- 5 μ l dNTP-Gemisch (2 mM je Nucleotid)
- 15 5 μ l 10x PCR-Puffer
- 36,5 μ l H₂O
- 0,5 μ l Taq-Polymerase (2,5 Units)

Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

20

1. Schritt: Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 94°C, 30 s.
2. Schritt: Anlagern der Primer an die DNA-Einzelstränge bei 50°C, 2 min.
3. Schritt: DNA-Synthese bei 72°C, 3 min.

25

Beim letzten Zyklus wurde die DNA-Synthese 5 min lang durchgeführt und der Ansatz danach auf 4°C heruntergekühlt. Für die Analyse wurden 10 μ l des Ansatzes auf einem 1 bis 2%igen Agarosegel analysiert.

Vorwärtsprimer: A20-2, A20-3, A20-4, A20-5 (siehe Tabelle 1)

Rückwärtsprimer: A20-6a, A20-6b (siehe Tabelle 1)

30

Matrize: A20R-Gesamt-RNA

Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden jeweils paarweise in PCR-Reaktionen kombiniert. Der Ansatz A20-3/A20-6b führte zur Anreicherung einer ca. 630 bp großen cDNA, die zur Überprüfung ihrer Spezifität mit Kombinationen der Primer A20-3, A20-4 und A20-5 mit dem Primer A20-6b reamplifiziert wurde. Zur Erhöhung der Stringenz wurde bei der Reamplifikation eine Anlagerungstemperatur von 55°C gewählt und nur 35 PCR-Zyklen durchgeführt. Nach Klonierung und Sequenzierung des erhaltenen Fragments (Name: A20-5/-6b) mit Standardmethoden erhält man die in Tabelle 2 gezeigten Sequenzdaten.

35

Beispiel 6: Northern Hybridisierung

40

Als Hybridisierungslösung wurde eine fertige ExpressHyb®-Lösung von der Firma Clontech verwendet, die in einer Stunde Hybridisierungszeit die zuvor markierte Gensonde (radioaktiv oder nicht-radioaktiv) an die eventuell vorhandene komplementäre DNA-Sequenz des Trägerfilters bindet.

Zusätzlich benötigte Reagenzien:

45

- 20xSSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0)
- Waschlösung 1: 2x SSC; 0,05% SDS
- Waschlösung 2: 0,1x SSC; 0,1% SDS
- Waschlösung 3: 2x SSC; 0,1% SDS

50

1. Hybridisierung mit nicht radioaktiv markierten Gensonden mit der ExpressHyb-Lösung (Clontech)

Die ExpressHyb®-Lösung wurde auf 68°C erwärmt und dabei gerührt, so daß keine Präzipitate verblieben. Nun wurde die Membran (10 \times 10-cm) in mindestens 5 ml ExpressHyb®-Lösung prähybridisiert, in dem man bei 68°C für eine halbe Stunde kontinuierlich in einem Hybridisierungssofen mischte. Die nicht radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde mit 5 ml frischer ExpressHyb®-Lösung vermengt. Nun ersetzte man die Prähybridisierungslösung durch diese ExpressHyb®-Lösung und ließ den Blot für eine Stunde bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubieren.

55

Nach der Inkubation wurde für 30 min mit 20 ml der Waschlösung 3 (pro 100 cm² Membran) bei Raumtemperatur gewaschen, wobei die Lösung einmal ersetzt wurde. Der zweite Waschschrift erfolgte bei 50°C für 30 min mit Waschlösung 2. Auch hier wurde die Lösung einmal ersetzt. Danach ließ man die überschüssige Waschlösung von der Membran abtropfen und konnte die Membran dann direkt für die Chemilumineszenzdetektion verwenden.

60

2. Hybridisierung mit radioaktiv markierten Gensonden mit der ExpressHyb-Lösung (Clontech)

65

Die Hybridisierung erfolgte wie bei der nicht-radioaktiv markierten DNA-Sonde. Nach der Inkubation wurde dann aber mit Waschlösung 1 30–40 min bei Raumtemperatur unter mehrmaligen Ersetzen der Lösung gewa-

schen. Der zweite Wäscheschritt erfolgte mit Waschlösung 2 für 40 min bei 50°C. Dabei wurde einmal die Lösung ersetzt. Danach ließ man auch hier die überschüssige Waschlösung abtropfen und der Blot wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt. Der Blot wurde in einer Exponierungskassette bei -70°C exponiert oder im Phosphorimager (BIORAD) ausgewertet.

Die verwendete RNA und Hybridisierungssonde sind jeweils in den Figurenlegenden angegeben.

3. Zeitlicher Verlauf der mRNA-Spiegel der putativen RNA-Helikase unter dem Einfluß von Leflunomid bei A20.J und A20R-Zellen

Das Experiment ist in Fig. 3A und 3B und der dazugehörigen Figurenlegende dargestellt. Es zeigt sich bei allen untersuchten Zellen (A20.2J und A20R) eine Bande der Größe 4,4 kb. Die A20R geben ein sehr starkes Signal, A20.2J-Zellen nur ein sehr schwaches Signal, welches aber nach Behandlung dieser Zellen für eine oder 8 Stunden mit A77 1226 zunehmend stärker wird. A77 1226 induziert also die Bildung der hier untersuchten mRNA.

4.) Zeitlicher Verlauf der mRNA-Level der putativen RNA-Helikase bei Absetzung von A77 1226.

Das Experiment ist in Fig. 4A und 4B und der dazugehörigen Figurenlegende dargestellt. Mit dem Absetzen von A77 1226 sinkt der mRNA Level der untersuchten mRNA im Beobachtungszeitraum (bis 5 Monate).

5.) mRNA Level der putativen RNA-Helikase in acht verschiedenen humanen Geweben.

Das Experiment ist in Fig. 5 und der entsprechenden Legende beschrieben. Es zeigt sich, daß die mRNA-Spiegel in den untersuchten Geweben unterschiedlich sind. Da die mRNA-Expression mit der Leflunomidresistenz korreliert (siehe 3), sind muskuläre Organe wie Herz und Skelettmuskel möglicherweise weniger empfindlich gegenüber Leflunomid.

Tabelle 1

5			M	G	V	K	K		
1	A20-2	5'-ATG	GGN	GTN	AAR	AAR	GG	SEQ ID NO:7	
10			D	I	M	G	V		
2	A20-3	5'-GAT	ATY	ATS	GGN	GTN	AA	SEQ ID NO:8	
15			M	G	V	K	K	E	
3	A20-4	5'-ATG	GTN	GTN	AAR	AAR	GAR	AC	
20								SEQ ID NO: 9	
25			K	E	T	E	P	D	
4	A-20-5	5'-AAR	GAR	ACN	GAR	CCN	GAY	AA	
								SEQ ID NO: 10	
30			(D	M	T	A	S	T)	
5	A-20-6a	5'-RTC	CAT	NGT	NGC	NGA	NGT		
35								SEQ ID NO: 11	
40			(T	A	S	T	V	I)	
6	A-20-6b	5'-NGT	AGC	NGA	NGT	NAC	NAT		
								SEQ ID NO: 12	
45									
50									
55									
60									
65									

Tabelle 2

1	AAGGAGACGGAGCCGGACAAAGCTATGACAGAAGACGGGAAAGTGGACTACAGGACGGAG	60	5
	TTCTCTGCTCGGCCTGTTTCGATACTGTCTTCTGCCCTTTCACCTGATGTCCTGCCTC		
1	K E T E P D K A M T E D G K V D Y R T E -		
61	CAGAAGTTTGCAGATCACATGAAGGAGAAAAGCGAGGCCAGCAGTGAGTTTGCCAAGAAG	120	10
	GTCTTCAAACGTCTAGTGTACTTCCTCTTTTCGCTCCGGTCGTCACTCAAACGGTTCCTC		
21	Q K F A D H M K E K S E A S S E F A K K -		
121	AAGTCGATCCTGGAGCAGAGGCAGTACCTGCCATCTTTGCCGTGCAGCAGGAGCTCGTC	180	15
	TTCAGCTAGGACCTCGTCTCCGTATGGACGGGTAGAAACGGCACGTGCTCCTCGAGCAG		
41	K S I L E Q R Q Y L P I F A V Q Q E L V -	20	
181	ACCATCATCAGAGACAACAGCATTGTGGTCGTGGTCGGGGAGACAGGGAGTGGCAAGACC	240	
	TGGTAGTAGTCTCTGTTGTGCGTAACACCAGCACCAGCCCCCTCTGTCCCTCACCCTCTGG		
61	T I I R D N S I V V V V G E T G S G K T -	25	
241	ACTCAGCTGACCCAGTACTTGCATGAAGATGGTTACACGGACTATGGGATGATCGGGTGT	300	
	TGAGTCGACTGGGTCATGAACGTACTTCTACCAATGTGCCTGATACCCTACTAGCCCACA	30	
81	T Q L T Q Y L H E D G Y T D Y G M I G C -		
301	ACCCAGCCCCGGCGTGTGGCTGCCATGTGACGGCCAAAGAGTCAGTGAAGAGATGGGG	360	35
	TGGGTGCGGGCCGCACACCGACGGTACAGTCGCCGGTCTCTCAGTCACTTCTCTACCCC		
101	T Q P R R V A A M S A A K R V S E E M G -		
361	GGCAACCTTGGAGAAGAGGTGGGCTATGCCATCCGCTTTGAGGACTGCACTTCGGAAAAC	420	40
	CCGTTGGAACCTCTTCTCCACCCGATACGGTAGGCGAAACTCCTGACGTGAAGCCTTTTG		
121	G N L G E E V G Y A I R F E D C T S E N -		
421	AACCTTGATCAAGTACATGACGGATGGGATCCTGCTGCGCGAGTCCCTCCGGCAGGCTGAC	480	45
	TTGAACTAGTTCATGTACTGCCTACCCTAGGACGACGCGCTCAGGGAGGCCGTCCGACTG		
141	N L I K Y M T D G I L L R E S L R Q A D -		
481	CTGGACCACTACAGCGCCGTATCATGGATGAGGCCCCACGAGCGCTCCCTCAACACCGAC	540	50
	GACCTGGTGATGTCGCGGCAGTAGTACCTACTCCGGGTGCTCGCGAGGGAGTTGTGGCTG		
161	L D H Y S A V I M D E A H E R S L N T D -		
541	GTGCTTTTTGGGCTGCTCCGGGAGGTTGTGGCTCGAGGCTCAGACCTGAAGCTCATGGTT	600	55
	CACGAAAAACCCGACGAGGCCCTCCAACACCGAGCTCCGAGTCTGGACTTCGAGTACCAA		
181	V L F G L L R E V V A R G S D L K L M V -	60	
601	ACATCGGCTACT	612	
	TGTAGCCGATGA		
201	T S A T -		65

Patentansprüche

1. Nukleinsäure-bindendes Protein mit Helikase-Eigenschaften, dessen mRNA und deren Translationsprodukt unter Einfluß von Leflunomid oder ähnlich wirkenden Verbindungen verstärkt exprimiert wird.
2. Nukleinsäure-bindendes Protein mit Helikase-Eigenschaften nach Anspruch 1, welches aus einer Säugerzellelinie stammt.
3. Nukleinsäure-bindendes Protein mit Helikase-Eigenschaften nach Anspruch 1 oder 2, welches aus einem Abkömmling der murinen Zelllinie A20.2J stammt.
4. Nukleinsäure-bindendes Protein mit Helikase-Eigenschaften nach Anspruch 1, 2 oder 3, enthaltend die Aminosäuresequenz gemäß Tabelle 2 oder Teile davon.
5. DNA kodierend für das Nukleinsäure-bindende Protein mit Helikase-Eigenschaften nach Anspruch 1 bis 4, oder Teile davon.
6. DNA nach Anspruch 5 mit der Nukleotidsequenz gemäß Tabelle 2.
7. DNA kodierend für ein Nukleinsäure-bindendes Protein mit Helikase-Eigenschaften dadurch gekennzeichnet, daß sie unter stringenten Bedingungen an die DNA-Sequenz gemäß Tabelle 2 hybridisiert.
8. Vektor, enthaltend eine DNA nach mindestens einem der Ansprüche 5 bis 7.
9. Expressionsvektor nach Anspruch 8 zur Expression des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften in einer passenden Wirtszelle.
10. Antisense-Expressionsvektor nach Anspruch 8 zur Expression einer Antisense-RNA, die mit der mRNA hybridisiert, die von der DNA gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 kodiert wird.
11. Wirtszelle enthaltend eine DNA nach einem der Ansprüche 5 bis 7 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 8—10.
12. Verfahren zur Herstellung des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a.) eine Wirtszelle nach Anspruch 11 kultiviert und
 - b.) das Nukleinsäure-bindende Protein mit Helikase-Eigenschaften isoliert wird.
13. Verwendung des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften als Bestandteil eines Assaysystems zur Auffindung neuer oder Identifizierung bereits bekannter Substanzen mit anticancerogener, anti-atherosklerotischer, immunsuppressiver, antiinflammatorischer, antiviraler, antifungaler oder antibakterieller Wirkung zur Behandlung z. B. der Alzheimerschen Krankheit, Krebs, Rheuma, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akuter und chronischer Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, Diabetes oder der Folgen einer Organtransplantation.
14. Verwendung des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das besagte Assaysystem so ausgestaltet ist,
 - a.) daß man ausreichende Mengen des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften nach gentechnischen Verfahren exprimiert,
 - b.) das erhaltene Protein kristallisiert,
 - c.) seine dreidimensionale Struktur aufklärt,
 - d.) mittels "Molecular Modelling" spezifische Modulatoren entwickelt, die vorzugsweise mit der ATP-Bindungsstelle, der Substrat-Bindungsstelle oder einem diese funktionellen Epitope beeinflussenden Wirkort des besagten Proteins wechselwirken sollen und anschließend
 - e.) einen Helikase-Assay durchführt, bei dem synthetische Oligoribonucleotide an eine Matrix fixiert und mit komplementären, markierten Oligoribonukleotiden hybridisiert werden, woraufhin das Nukleinsäure-bindende Protein mit Helikase-Eigenschaften in oder nicht in Gegenwart möglicher Modulatoren seiner Helikase-Eigenschaften eine bestimmte, meßbare Menge der markierten, nicht-matrixfixierten Oligoribonucleotide freisetzen kann.
15. Verwendung des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Helikase-Assay gemäß Anspruch 14e.) auf Mikrotiterplatten durchgeführt wird und so mit hoher Effizienz eine große Anzahl möglicher Modulatoren auf ihre Wirkung getestet werden.
16. Verwendung des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Helikase-Assay in der Weise durchgeführt wird, daß
 - (a) Leflunomidresistenz bei einer sonst nicht Leflunomid-resistenten Zelllinie durch Expression des rekombinanten Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften erreicht wird und
 - (b) die nach (a) erhaltene Zelllinie zum Screening nach Modulatoren besagten Proteins benutzt wird.
17. Verwendung des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften zur Isolierung spezifisch an dieses Protein bindender RNA's oder Ermittlung ihrer Oligoribonukleotidsequenz.
18. Verwendung des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - (a) besagtes Protein oder Teile davon an eine Matrix koppelt,
 - (b) die so hergestellte Affinitätsmatrix zur Anreicherung von RNA's, die spezifisch an das gekoppelte Protein oder Teile davon binden, aus RNA-Gemischen benutzt.
19. Verwendung des Nukleinsäure-bindenden Proteins mit Helikase-Eigenschaften nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich zu den Schritten (a) und (b) des Anspruch 16

- (c) die so angereicherten RNA-Moleküle mit PCR-Linkern versieht,
- (d) eine PCR-Anreicherung durchführt, und
- (e) die so erhaltenen PCR-Fragmente analysiert.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

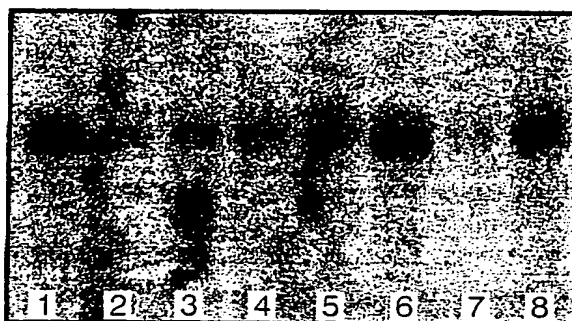
45

50

55

60

65

Fig. 5

	Zelle	% Stärke	Fläche mm ²	Stärke counts x mm ²	Mittelwert der counts
1	Herz	21.6	21.450	50406	1937
2	Gehirn	8.3	13.500	21494	1179
3	Placenta	6.8	11.660	17871	1119
4	Lunge	5.9	10.920	15913	1044
5	Leber	12.9	15.300	31126	1621
6	Ske.Muskel	29.5	21.660	65581	2614
7	Niere	3.7	14.000	12950	512
8	Pankreas	11.3	15.510	28051	1395

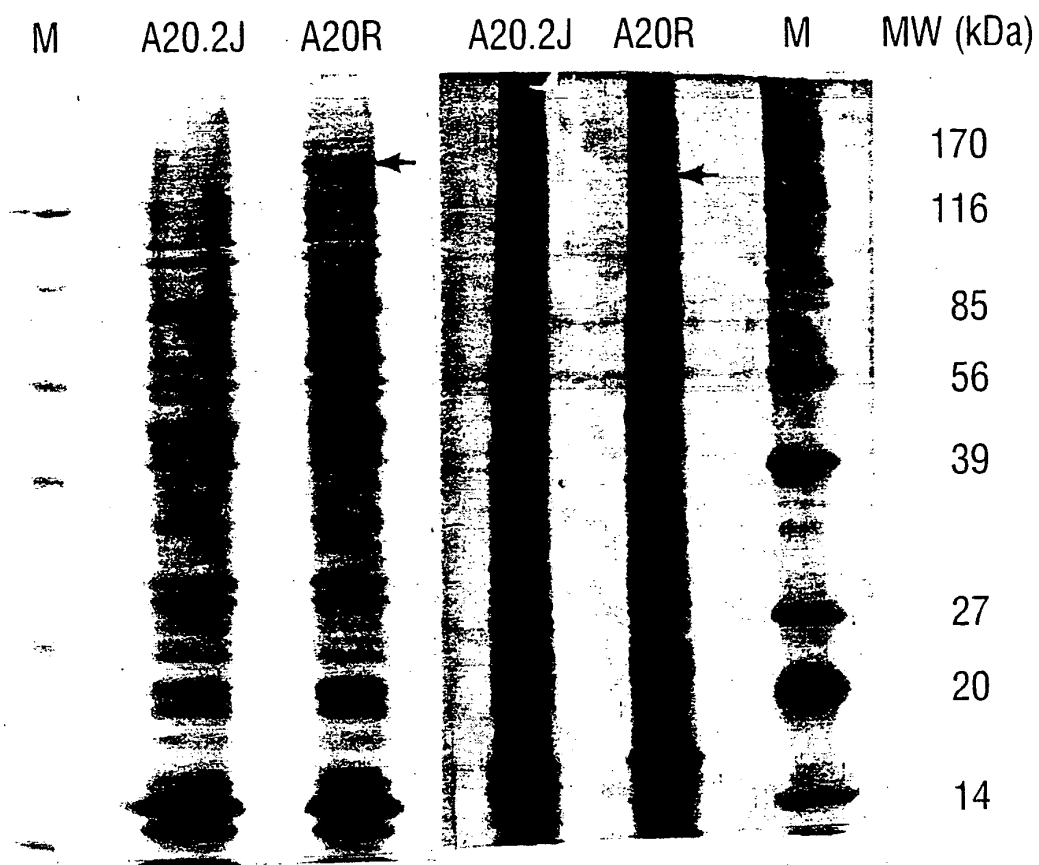


Fig. 1

Fig. 2

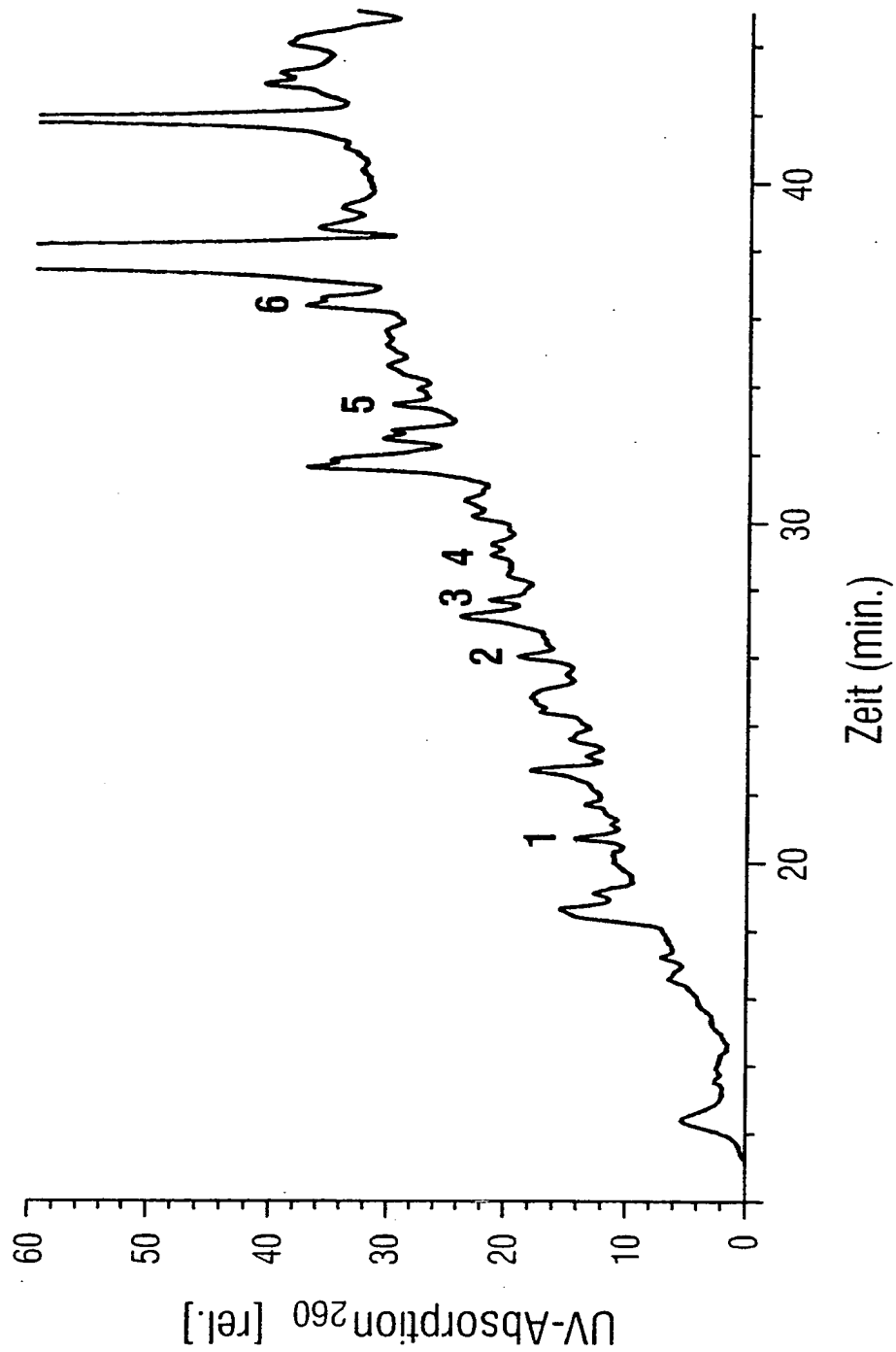
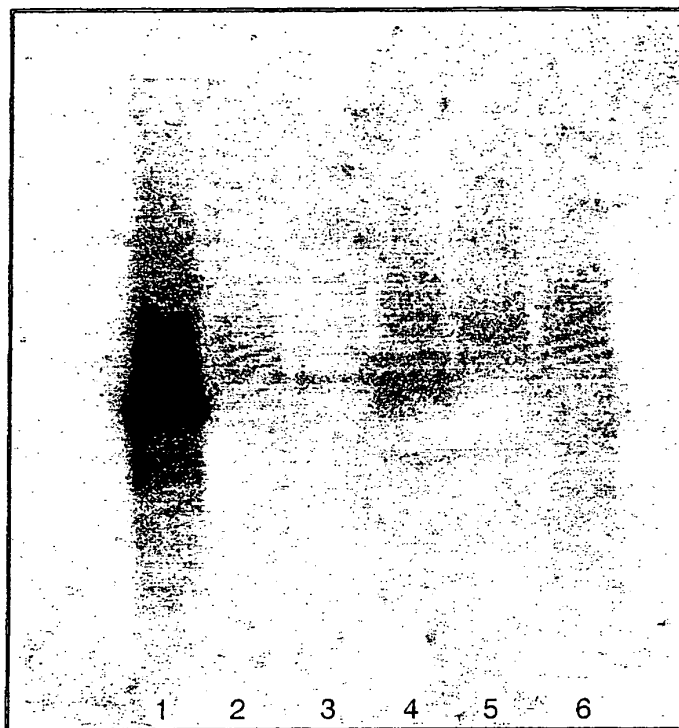
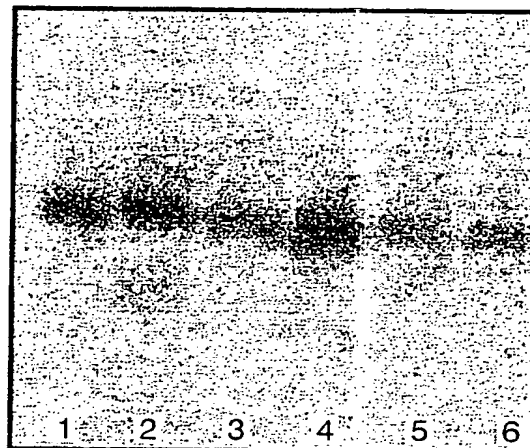
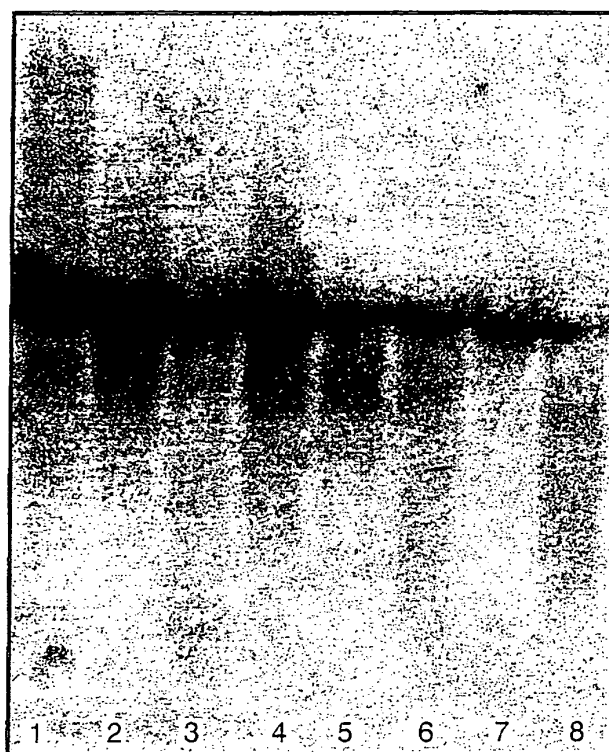


Fig. 3A

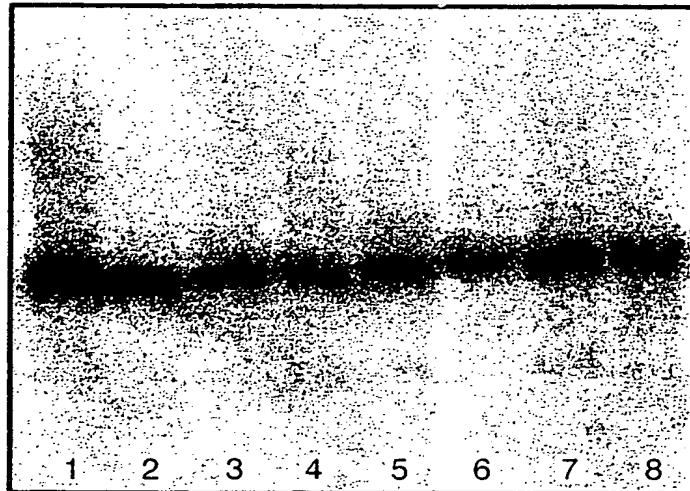
	Zelle	% Stärke	Fläche mm ²	Stärke counts x mm ²	Mittelwert der counts
1	A20R	93.2	86.400	909378	5534
2	A20.2J	0.6	22.010	33267	148
3	A20.2J 1h	1.0	22.010	27814	236
4	A20.2J 8h	4.0	22.010	60160	937
5	A20.2J 16h	0.7	22.010	32797	157
6	A20.2J 24h	0.5	22.010	27391	106

Fig. 3B

	Zelle	% Stärke	Fläche mm ²	Stärke counts x mm ²	Mittelwert der counts	Standard- abweichung
1	A20R	14.1	22.780	22913	576	334.5
2	A20.2J	19.3	22.780	27782	790	403.2
3	A20.2J 1h	14.1	22.780	22902	576	302.5
4	A20.2J 8h	26.6	22.780	34568	1088	416.4
5	A20.2J 16h	13.5	22.780	22332	551	278.9
6	A20.2J 24h	12.5	22.780	21470	513	310.2

Fig. 4A

	Zelle	% Stärke	Fläche mm ²	Stärke counts x mm ²	Mittelwert der counts	Standard- abweichung
1	A20R	29.0	62.410	361861	5559	3999.1
2	A20R 1d	23.3	44.400	289814	6289	3549.0
3	A20R 2d	11.1	36.190	141943	3683	1457.7
4	A20R 3d	17.2	34.200	214247	6026	3026.5
5	A20R 4d	5.7	21.390	73851	3214	1195.2
6	A20R 5d	6.4	17.940	81115	4283	1363.3
7	A20R 14d	5.2	17.980	66433	3456	1145.5
8	A20R 5Monate	1.9	15.840	27014	1467	832.5

Fig. 4B

	Zelle	% Stärke	Fläche mm ²	Stärke counts x mm ²	Mittelwert der counts	Standard- abweichung
1	A20R	17.5	27.200	47005	941	832.2
2	A20R 1d	12.3	27.200	38127	659	646.3
3	A20R 2d	11.6	27.200	37724	625	590.2
4	A20R 3d	5.9	27.200	25075	315	384.5
5	A20R 4d	12.8	27.200	38766	687	635.5
6	A20R 5d	8.8	27.200	29539	474	481.5
7	A20R 14d	18.4	27.200	51164	986	820.9
8	A20R 5Monate	12.7	27.200	37462	682	605.5